

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ БИКА І БАРАНА ДО ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

А. О. Мазур, О. Є. Ніпот, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова
nipotel71@gmail.com

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна, cryo@online.kharkov.ua

У роботі вивчали чутливість еритроцитів ссавців до постгіпертонічного шоку, який є одним з основних чинників ушкодження клітин при їх кріоконсервуванні. Метою роботи було порівняльне вивчення особливостей прояву постгіпертонічного лізису еритроцитів бика і барана при варіюванні концентрації NaCl в середовищі дегідратації і температури інкубації клітин.

Постгіпертонічний шок здійснювали перенесенням еритроцитів з гіпертонічних середовищ (1,0–2,5 моль/л NaCl) в ізотонічний розчин (0,15 моль/л NaCl) за різних значень температури (від 0 до 37 °C). Рівень гемолізу визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм.

Показано, що зі збільшенням концентрації солі в середовищі дегідратації підвищується рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика і барана як за температури 37 °C, так і за 0 °C. Слід зазначити, що за 37 °C чутливішими до дії постгіпертонічного шоку були еритроцити барана, а за 0 °C — клітини бика.

Аналіз температурних залежностей постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика і барана показав суттєву різницю для клітин цих ссавців. Так, температурна залежність еритроцитів барана має мінімум за 20 °C, а еритроцити бика демонструють однаковий рівень пошкодження в діапазоні температур 0–10 °C і зростання гемолізу за подальшого підвищення температури. Слід зазначити, що при температурах вище 15 °C постгіпертонічний гемоліз еритроцитів барана практично у 2 рази перевищує рівень пошкодження клітин бика.

Виявлені особливості чутливості еритроцитів бика і барана до дії постгіпертонічного шоку можна пояснити відмінностями механіко-еластичних властивостей їх мембран, які можуть бути обумовлені особливостями формування мембранних кластерів і їх взаємодій в рамках комплексу цитоскелет-мембрана.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК, РЕГІДРАТАЦІЯ, ДЕГІДРАТАЦІЯ, ТЕМПЕРАТУРА, ОСМОЛЯЛЬНІСТЬ СЕРЕДОВИЩА, ГЕМОЛІЗ

COMPARATIVE STUDY OF SENSITIVITY OF BOVINE AND RAM ERYTHROCYTES TO POST-HYPERTONIC SHOCK

A. A. Mazur, E. Ye. Nipot, N. V. Orlova, N. M. Shpakova
nipotel71@gmail.com

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavska str., Kharkiv 61016, Ukraine, cryo@online.kharkov.ua

The sensitivity of mammalian erythrocytes to post-hypertonic shock which is one of the main factors of an injury of the cells during their cryopreservation was studied in this work. The research aim was to comparatively investigate the sensitivity of bovine and ram erythrocytes to the action of post-hypertonic shock with varying NaCl concentration in the dehydration medium and temperature.

Post-hypertonic shock was initiated by transferring the erythrocytes from hypertonic media (1.0–2.5 mol/L NaCl) to an isotonic solution (0.15 mol/L NaCl) at different temperatures (0 to 37 °C). The level of hemolysis was determined spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm.

It has been shown that with a rise of salt concentration in the dehydration medium, the level of post-hypertonic hemolysis of bovine and ram erythrocytes increased at the both temperatures 37 and 0 °C. It should be noted that the ram erythrocytes were more sensitive to the action of post-hypertonic shock at 37 °C and the bovine ones were more sensitive at 0 °C.

The analysis of the temperature dependences of post-hypertonic hemolysis of bovine and ram erythrocytes showed a significant difference for the cells of these mammals. Thus, the temperature dependence of ram erythrocytes had a minimum at 20 °C, and bovine ones exhibited the same level of damage within the temperature range of 0–10 °C and the growth of hemolysis with a further increase in temperature. It should be noted that at

the temperatures above 15 °C the post-hypertonic hemolysis of ram erythrocytes was almost 2 times higher than the level of damage for bovine cells.

The revealed features of the sensitivity of bovine and ram erythrocytes to the action of post-hypertonic shock could be explained by the differences in the mechano-elastic properties of their membranes, which might be due to the peculiarities of the formation of membrane clusters and their interactions within the cytoskeleton-membrane complex.

Keywords: MAMMALIAN ERYTHROCYTES, POST-HYPERTONIC SHOCK, REHYDRATION, DEHYDRATION, TEMPERATURE, MEDIUM OSMOLALITY, HEMOLYSIS

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ БЫКА И БАРАНА К ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

A. A. Мазур, E. E. Нупот, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова

nipotel71@gmail.com

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016, Украина, cryo@online.kharkov.ua

В работе изучали чувствительность эритроцитов млекопитающих к постгипертоническому шоку, который является одним из основных факторов повреждения клеток при их криоконсервировании. Целью работы было сравнительное изучение чувствительности эритроцитов быка и барана к действию постгипертонического шока при варьировании концентрации NaCl в среде дегидратации и температуры инкубации клеток.

Постгипертонический шок осуществляли перенесением эритроцитов из гипертонических сред (1,0–2,5 моль/л NaCl) в изотонический раствор (0,15 моль/л NaCl) при разных значениях температуры (от 0 до 37 °C). Уровень гемолиза определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм.

Показано, что с увеличением концентрации соли в среде дегидратации повышается уровень постгипертонического гемолиза эритроцитов быка и барана при температуре как 37 °C, так и 0 °C. Следует отметить, что при 37 °C более чувствительными к действию постгипертонического шока были эритроциты барана, а при 0 °C — клетки быка.

Анализ температурных зависимостей постгипертонического гемолиза эритроцитов быка и барана показал существенное различие для клеток этих млекопитающих. Так, температурная зависимость эритроцитов барана имеет минимум при 20 °C, а эритроциты быка демонстрируют одинаковый уровень повреждения в диапазоне температур 0–10 °C и рост гемолиза при дальнейшем повышении температуры. Следует отметить, что при температурах выше 15 °C постгипертонический гемолиз эритроцитов барана практически в 2 раза превышает уровень повреждения клеток быка.

Выявленные особенности чувствительности эритроцитов быка и барана к действию постгипертонического шока можно объяснить различиями механико-эластичных свойств их мембран, которые могут быть обусловлены особенностями формирования мембранных кластеров и их взаимодействий в рамках комплекса цитоскелет-мембрана.

Ключевые слова: ЭРИТРОЦИТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК, РЕГИДРАТАЦИЯ, ДЕГИДРАТАЦИЯ, TEMPERATURE, ОСМОЛЯЛЬНОСТЬ СРЕДЫ, ГЕМОЛИЗ

На сьогодні існує низка методичних підходів низькотемпературного зберігання клітин, однак жоден із них не є достатньо ефективним. Розробка нових і оптимізація наявних методів вимагає детальнішого знання механізмів пошкодження клітин під час криоконсервування. Для цього часто використовують модельні експерименти — такі, як гіпертонічний шок і гіпертонічний криогемолиз. Їх використовують при вивченні дії на клітини криопошкоджуючих

факторів, які виникають на етапі заморожування — високих концентрацій солей і зниження температури [1, 3, 7, 16, 17].

При відігріванні біологічного матеріалу відбувається зменшення концентрації позаклітинного розчину за рахунок переходу води в рідкий стан. Внаслідок зниження тоничності позаклітинного середовища починається проникнення надлишкової води у клітину, що призводить до порушення цілісності клітинних

структур. Це явище має назву постгіпертонічного лізису (ПГЛ) або постгіпертонічного гемолізу. ПГЛ можна розглядати як один з основних чинників ушкодження клітин на кінцевому етапі їх кріоконсервування [7, 14, 15].

Для вивчення ПГЛ доцільно використовувати нативні еритроцити різних ссавців [9, 10], які відрізняються між собою за низкою параметрів. Це дозволить виявити показники, відповідальні за стійкість еритроцитів до дії ПГЛ. Для дослідження були обрані еритроцити бика і барана, які відрізняються за складом цитоплазми та геометричними показниками. Еритроцити бика є високонатрієвими [10], натомість еритроцити барана мають збалансований вміст катіонів натрію і калію [10]. Що стосується геометричних характеристик, еритроцити барана мають менший діаметр і площу поверхні, ніж клітини бика [4, 9, 10, 12]. Деякі менш значні відмінності стосуються і складу еритроцитарних мембран цих тварин [6, 10].

Мета роботи — порівняльне вивчення чутливості еритроцитів бика і барана до дії постгіпертонічного шоку при варіюванні концентрації NaCl в середовищі дегідратації і температури інкубації клітин.

Матеріали та методи

У роботі були використані еритроцити бика і барана, заготовлені з допомогою гемоконсерванта «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Еритроцити були тричі відмиті шляхом центрифугування (центрифуга «ОПн-3У4.2», Киргизстан) при 3000 об/хв протягом 3 хвилин у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 моль/л; фосфатний буфер 0,01 моль/л, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією після кожного центрифугування. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин за температури 0 °С. Всі середовища при-

готовлені на фосфатному буфері (0,01 моль/л, рН 7,4). Постгіпертонічний шок здійснювали перенесенням еритроцитів з гіпертонічних розчинів (середовище дегідратації) в ізотонічне середовище (середовище регідратації) за різних значень температури (від 0 до 37 °С). Середовищами дегідратації були розчини хлориду натрію в діапазоні концентрацій 1,0–2,5 моль/л, середовищем регідратації — 0,15 моль/л NaCl. Еритроцити інкубували 20 хвилин в середовищах дегідратації і 5 хвилин — в середовищі регідратації.

Рівень гемолізу еритроцитів вимірювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм і розраховували у відсотках стосовно 100 % гемолізу. За 100 % було прийнято поглинання проби, в яку був доданий тритон Х-100 («Merck», Німеччина) в концентрації 0,1 %. Порогову концентрацію визначали як мінімальну концентрацію NaCl, при якій гемолиз перевищував 10 %. Осмоляльність розчинів визначали кріоскопічним методом з використанням осмометрів «ОМКА-1Ц-01» (Україна).

Статистичну обробку проводили за допомогою програми *Statistica 6.0* («StatSoft Inc.», США), використовуючи критерій Манна-Уїтні для перевірки статистичної значимості відмінностей досліджуваних числових показників.

Результати й обговорення

Еритроцити бика і барана піддавали дії постгіпертонічного шоку інкубуванням клітин в середовищах дегідратації з подальшим перенесенням у середовище регідратації за температури 37°С. Отримані результати представлені на рис 1. Як видно, постгіпертонічне пошкодження еритроцитів ссавців починає розвиватися в тому випадку, коли концентрація хлориду натрію в середовищі дегідратації перевищує 1,25 моль/л. Порогові концентрації NaCl для еритроцитів бика і барана збігаються (1,5 моль/л NaCl). В діапазоні концентрацій хлориду натрію від 1,5 моль/л до 2,0 моль/л в середовищі дегідратації для еритроцитів досліджуваних ссавців спостерігається різний характер розвитку постгіпертонічного лізису. Для клітин бика характерний поступовий розвиток постгіпертонічного гемолізу, а для еритроцитів

барана — різке збільшення рівня пошкодження. При цьому рівень гемолізу еритроцитів барана вищий за аналогічні показники клітин бика. Максимальне значення постгіпертонічного гемолізу (100 %) для еритроцитів бика спостерігається при концентраціях NaCl в середовищі дегідратації 2,5 моль/л, а для клітин барана — 2 моль/л.

З вищевикладеного випливає, що за температури 37 °С еритроцити барана більш чутливі до дії постгіпертонічного шоку, ніж клітини бика.

Представлені на рис. 2 результати відображають рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика і барана при температурі 0 °С. У цьому випадку пороговий рівень ушкодження еритроцитів бика спостерігається при концентраціях NaCl у середовищі дегідратації 1,25 моль/л, а клітин барана — 1,5 моль/л. За цієї температури для клітин обох ссавців також спостерігається різна динаміка розвитку гемолітичного процесу: для клітин бика — поступова, а барана — різка. Слід зазначити, що для еритроцитів бика, порівняно з клітинами барана, реєструються вищі значення постгіпертонічного гемолізу при відповідних концентраціях NaCl в діапазоні 1–1,75 моль/л. За подальшого збільшення концентрації солі у середовищі дегідратації клітини барана, порівняно з еритроцитами бика, демонструють більшу чутливість до дії ПГЛ і досягають максимального рівня пошкодження при менших концентраціях солі. Як і за температури як 37 °С, за 0 °С максимальний рівень ушкодження еритроцитів бика спостерігається за концентрацій NaCl в середовищі дегідратації 2,5 моль/л, а клітин барана — 2 моль/л.

Порівняння даних (рис. 1, 2) вказує, що як за 37 °С, так і за 0 °С рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика і барана підвищується зі збільшенням концентрації солі в середовищі дегідратації. Однак спостерігаються явні відмінності в чутливості цих клітин до ПГШ в діапазоні 1,00–1,75 моль/л NaCl. При 37 °С чутливішими до дії ПГШ є еритроцити барана, а при 0 °С — еритроцити бика.

З отриманих даних (рис. 1 і 2) видно, що еритроцити ссавців обох видів чутливі до зміни концентрації солі в навколишньому середови-

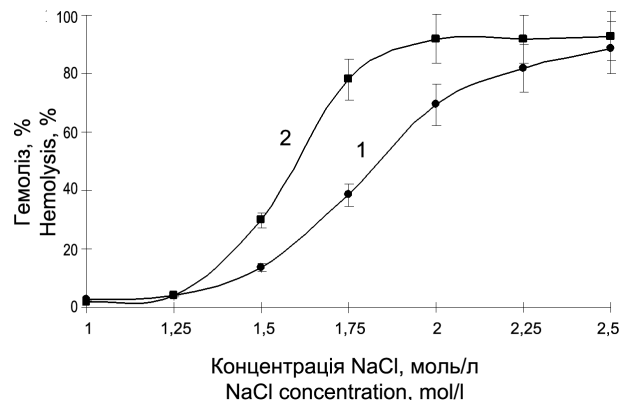


Рис. 1. Залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика (1) і барана (2) від концентрації хлориду натрію в середовищі дегідратації при 37 °С

Fig. 1. Post-hypertonic hemolysis of bovine (1) and ram (2) erythrocytes on sodium chloride concentration in dehydration medium at 37 °С

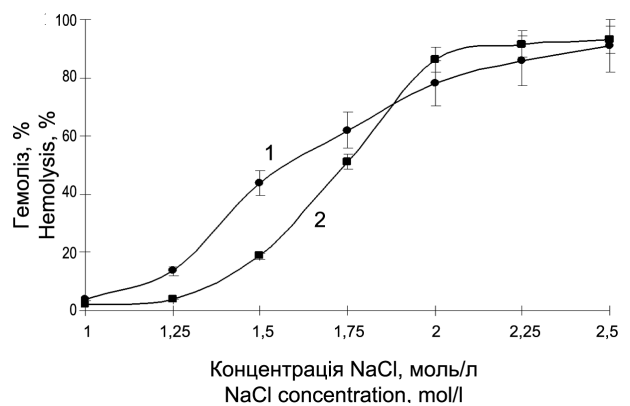


Рис. 2. Залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика (1) і барана (2) від концентрації хлориду натрію в середовищі дегідратації при 0 °С

Fig. 2. Dependence of post-hypertonic hemolysis of bovine (1) and ram (2) erythrocytes on sodium chloride concentration in dehydration medium at 0 °С

щі. З ростом осмотичного навантаження на клітину в середовищі дегідратації збільшується рівень пошкодження при подальшій регідратації. Однак реакція на зміну осмоляльності в середовищі дегідратації у клітин кожного з досліджуваних ссавців має свої особливості. Наприклад, гемолітична залежність еритроцитів барана має яскраво виражений S-подібний характер, тоді як наростання пошкодження клітин бика при збільшенні концентрації солі в середовищі дегідратації відбувається плавніше. Цей факт може свідчити про вираженішу гетерогенність популяції еритроцитів бика і відповідно поступове наростання кількості пошкоджених клітин.

Для ретельнішого вивчення температурної чутливості еритроцитів бика і барана до дії

ПГШ дослідження проводили при різних температурах від 0 до 37 °С з кроком у 5 градусів. Як середовище дегідратації використовували 1,75 моль/л NaCl. Дані представлені на рис. 3.

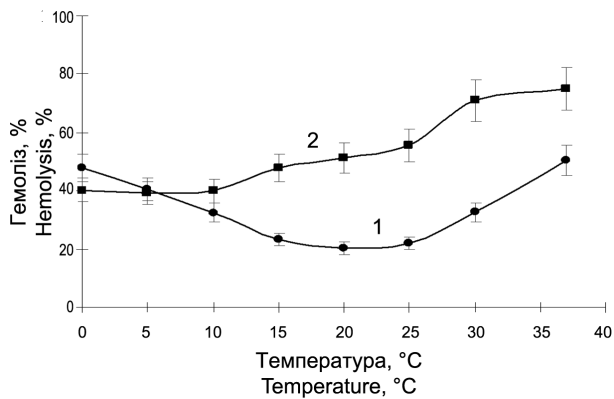


Рис. 3. Залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика (1) і барана (2) від температури. Середовище дегідратації 1,75 моль/л NaCl

Fig. 3. Dependence of post-hypertonic hemolysis of bovine (1) and ram (2) erythrocytes on temperature. Dehydration medium of 1.75 mol/l NaCl

Аналіз температурних залежностей постгіпертонічного гемолізу еритроцитів бика і барана показав різний напрямок зміни чутливості цих клітин до дії ПГЛ за різної температури. Для еритроцитів бика спостерігалось зменшення рівня ПГЛ при підвищенні температури з досягненням мінімуму при 20 °С і подальшим зростанням у діапазоні 20–37 °С. Еритроцити барана характеризувалися незмінним рівнем чутливості в діапазоні 0–10 °С і подальшим зростанням у діапазоні 10–37 °С. Таким чином, чутливість еритроцитів барана і бика до дії ПГШ залежить від температури і є видоспецифічною.

Як показали дослідження (рис. 3), постгіпертонічне пошкодження еритроцитів бика і барана є залежними від температури. Причому характер залежності значно відрізняється для еритроцитів цих ссавців. Температурна крива еритроцитів барана має явний мінімум при 20 °С, а еритроцити бика демонструють однаковий рівень пошкодження в діапазоні 0–10 °С і досить відчутне зростання пошкодження у більш високотемпературному діапазоні (рис. 3). Слід також зазначити, що при температурах, вищих за 15 °С, постгіпертонічний гемоліз еритроцитів барана практично у 2 рази

перевищує рівень пошкодження клітин бика. Ці результати можуть свідчити про меншу здатність мембран клітин барана до деформації і узгоджуються з даними роботи [5], де показана значна чутливість цих еритроцитів до механічної зсувної напруги.

Ще одним чинником, що обумовлює більшу чутливість до постгіпертонічного шоку еритроцитів барана порівняно з клітинами бика, ймовірно, може слугувати вищий рівень накопичення іонів натрію всередині клітини під час дегідратації. Відомо, що деформація мембрани під час дегідратації ініціює латеральний перерозподіл мембранних компонентів, що збільшує проникність для катіонів [8]. Згідно з роботою [11], іони, що надходять у клітину з навколишнього гіперосмотичного розчину, починають зв'язуватися з цитоплазматичними білками. Це призводить до зменшення числа іонів в цитоплазмі, ініціюючи їх подальший приплив з позаклітинного середовища. На етапі регідратації білки звільняють іони, обумовлюючи надмірне надходження води в клітину. Це призводить до перевищення критичного гемолітичного обсягу клітини і її руйнуванню. Ймовірно, в основі виявленої більшої чутливості еритроцитів барана до постгіпертонічного шоку (порівняно з клітинами бика) лежить їх здатність накопичувати вищий рівень іонів натрію всередині клітини під час дегідратації.

Відомо, що найчутливішою до температурного впливу є фосфоліпідна частина мембрани [3]. Це дозволяє припустити, що саме вона відповідальна за розвиток постгіпертонічного пошкодження еритроцитів. Вагомість ролі фосфоліпідної складової мембрани у збереженні цілісності клітин ссавців при кріоконсервуванні також підтверджується поліпшенням збереження еритроцитів барана при застосуванні антиокислювачів спільно з кріоконсервувальними речовинами [13]. Однак порівняння фосфоліпідного складу еритроцитів барана і бика не виявляє значних відмінностей у складі або переважному вмісті фосфоліпідів [2, 17]. Це не дозволяє пояснити таку значну різницю в температурній чутливості цих клітин до дії постгіпертонічного шоку особливостями їх фосфоліпідного складу. Таким чином, можна припустити, що провідну роль у формуванні пошкоджень відіграє не склад,

а організація мембрани, а саме чергування білок-ліпідних кластерів в мембранах цих клітин.

Висновки

З вищевикладеного випливає, що еритроцити бика і барана значно відрізняються за чутливістю до постгіпертонічного шоку. При цьому рівень їх пошкодження залежить від температури. При 37 °C чутливішими до дії постгіпертонічного середовища є еритроцити барана, а при 0 °C — еритроцити бика. Ймовірно, таку різницю можна пояснити різними механіко-еластичними властивостями мембран еритроцитів цих ссавців, що обумовлені різною організацією мембрани. Незважаючи на близький фосfolіпідний і білковий склад, формування мембранних кластерів та їх взаємодія у межах комплексу мембрана-цитоскелет може значно відрізнятися в еритроцитів бика і барана.

Перспективи подальших досліджень.

У подальших дослідженнях планується залучати еритроцити різних видів ссавців та застосовувати цільову модифікацію клітин. Це може надати багато важливої інформації про стійкість клітин до факторів кріоповшкодження і можливість запобігати пошкодженню еритроцитів при низькотемпературному зберіганні.

1. Alexandrova D. I., Orlova N. V., Shpakova N. M. A comparative study of the sensitivity of previously dehydrated human and bovine red blood cells to hypertonic. *Problems of cryobiology*, 2007, no. 4, pp. 327–334. (in Russian)

2. Al-Qarawi A. A., Mousa H. M. Lipid concentrations in erythrocyte membranes in normal, starved, dehydrated and rehydrated camels (*Camelus dromedarius*), and in normal sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra hircus*). *Eur. J. Arid Environ.*, 2004, vol. 59, no. 4, pp. 675–683.

3. Belous A. M., Bondarenko V. A., Babiychuk L. A. Single mechanism of cell damage in thermal shock, freezing and posthypertonic lysis. *Cryobiology*, 1985, no. 2, pp. 25–32. (in Russian)

4. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 ani-

mal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. *Eur. Biophys. J.*, 2013, vol. 42, no. 1, pp. 33–46. DOI: 10.1007/s00249-012-0868-7.

5. Ding J., Niu S., Chen Z., Zhang T., Griffith B. P., Wu Z. J. Shear-induced hemolysis: species differences. *Artif Organs.*, 2015, vol. 39, no. 9, pp. 795–802. DOI: 10.1111/aor.12459.

6. Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M., Wainszelbaum M., Brown W. C., McElwain T. F., Palmer G. H. An unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, no. 14, pp. 7736–7741. DOI: 10.1073/pnas.131580998.

7. Goltsev A. N., Gordienko E. A., Babiychuk G. A., eds. *Current problems of cryobiology and cryomedicine*. Kharkov, 2012, Rayder Publ., 2012, 767 p. (in Russian)

8. Gordienko E. A., Tovstyak V. V. *Physics of biomembranes*. Kyiv, Naukova dumka, 2009, 277 p. (in Ukrainian)

9. Lang F., Föller M. *Erythrocytes: Physiology and Pathophysiology*. London, Imperial College Press Publ., 2012, 443 p.

10. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J. Cell. Mol. Med.*, 2000, vol. 4, no. 4, pp. 270–276.

11. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*, 2008, vol. 57, no. 3, pp. 251–256. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.09.007.

12. Nezar A., Melizi M., Belabbas H. Species determination using the red blood cells morphometry in domestic animals. *Vet. World*, 2016, vol. 9, no. 9, pp. 960–963.

13. Noha A. S. Salidroside as a novel protective agent to improve red blood cell cryopreservation. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 9, pp. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0162748.

14. Patelaros S. V., Synchikova O. P. Osmotic behavior of erythrocytes in post-hypertensive lysis. *Problems of cryobiology*, 1994, no. 3, pp. 35–40. (in Russian)

15. Semyonova E. A., Ershova N. A., Ershov S. S., Peculiarities of posthypertensive lysis of erythrocytes of some mammals. *Problems of cryobiology and cryomedicine*, 2016, vol. 26, no. 1, pp. 73–83. (in Russian)

16. Shpakova N. M., Ershov S. S. Hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes. *Problems of cryobiology*, 2006, no. 3, pp. 286–291. (in Russian)

17. Shpakova N. M. The temperature and osmotic resistance of red blood cells of different species of mammals. Dr. biological sci. diss. Kharkiv, 2014, 392 p. (in Russian)